

FARMAKOLÓGIAI PREKONDICIONÁLÁS ÚJ LEHETŐSÉGEI: a biglikán és mikroRNS-ek szerepe

**Ph.D. Tézis
Összefoglaló**

Gáspár Renáta, MSc

**Témavezetők: Csont Tamás, MD, PhD
Görbe Anikó, MD, PhD**



Metabolikus Betegségek és Jelátvitel Kutatócsoport

Biokémiai Intézet

Általános Orvostudományi kar

Szegedi Tudományegyetem

2016

Publikációk listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája:

1. **Renáta Gáspár**, Márton Pipicz, Fatime Hawchar, Dávid Kovács, Luna Djirackor, Anikó Görbe, Zoltán V. Varga, Mónika Kiricsi, Goran Petrovski, Attila Gácser, Csaba Csonka, Tamás Csont: The cytoprotective effect of biglycan core protein involves Toll-like receptor 4 signaling in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. (2016);99:138-150. [IF:4.874]
2. Márta Sárközy*, **Renáta Gáspár***, Kamilla Gömöri, László Dux, Csaba Csonka, Tamás Csont: Effects of Proteoglycans on Oxidative/Nitrative Stress. Curr Org Chem (2016) közlésre elfogadott [IF:1.949]
3. Varga ZV, Zvara A, Faragó N, Kocsis GF, Pipicz M, **Gáspár R**, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Puskás LG, Thum T, Csont T, Ferdinandy P.: MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: protectomiRs. Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2014);307:H216-27. [IF:3.838]

A tézis alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 10,661

A tézishoz közvetlenül nem tartozó közlemények listája:

4. Kiscsatári L, Varga Z, Schally AV, **Gáspár R**, Nagy CT, Giricz Z, Ferdinandy P, Fábíán G, Kahán Z, Görbe A.: Protection of neonatal rat cardiac myocytes against radiation-induced damage with agonists of growth hormone-releasing hormone. Pharmacol Res. (2016);111:859–866. [IF:4.816]
5. Márta Sárközy, Gergő Szűcs, Veronika Fekete, Márton Pipicz, Katalin Éder, **Renáta Gáspár**, Andrea Sója, Judit Pipis, Péter Ferdinandy, Csaba Csonka, Tamás Csont: Transcriptomic alterations in the heart of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Cardiovasc Diabetol (2016);15:110. [IF:4.534]
6. Kovács D, Igaz N, Keskeny C, Bélteky P, Tóth T, **Gáspár R**, Madarász D, Rázga Z, Kónya Z, Boros IM, Kiricsi M.: Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. Sci Rep. (2016);6:27902. [IF:5.228]

7. Gergely S, Hegedűs C, Lakatos P, Kovács K, **Gáspár R**, Csont T, Virág L.: High Throughput Screening Identifies a Novel Compound Protecting Cardiomyocytes from Doxorubicin-Induced Damage. *Oxid Med Cell Longev.* (2015);2015:178513. [IF:4.44]
8. Barlaka E, Görbe A, **Gáspár R**, Pálóczi J, Ferdinandy P, Lazou A.: Activation of PPAR β/δ protects cardiac myocytes from oxidative stress-induced apoptosis by suppressing generation of reactive oxygen/nitrogen species and expression of matrix metalloproteinases. *Pharmacol Res.* (2015);95-96:102-10. [IF:4.816]
9. Pipicz M, Varga ZV, Kupai K, **Gáspár R**, Kocsis GF, Csonka C, Csont T.: Rapid ventricular pacing-induced postconditioning attenuates reperfusion injury: effects on peroxynitrite, RISK and SAFE pathways. *Br J Pharmacol.* (2015);172:3472-83. [IF:5.259]
10. Csont T, Sárközy M, Szűcs G, Szűcs C, Bárkányi J, Bencsik P, **Gáspár R**, Földesi I, Csonka C, Kónya C, Ferdinandy P.: Effect of a multivitamin preparation supplemented with phytosterol on serum lipids and infarct size in rats fed with normal and high cholesterol diet. *Lipids Health Dis.* (2013);12:138. [IF:2.31]
11. Varga ZV, Kupai K, Szűcs G, **Gáspár R**, Pálóczi J, Faragó N, Zvara A, Puskás LG, Rázga Z, Tiszlavicz L, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Ferdinandy P, Csont T. MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* (2013);62:111-21. [IF:5.148]
12. Bodai L, Zsindely N, **Gáspár R**, Kristó I, Komonyi O, Boros IM.: Ecdysone induced gene expression is associated with acetylation of histone H3 lysine 23 in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* (2012);e40565. [IF:3.73]

Tudományos közlemények összesített impakt faktora: 50,942

Bevezetés

A kardiovaszkuláris megbetegedések (CVD) vezetik a halálozási statisztikákat világszerte és hazánkban is. A szív- és érrendszert érintő kórképcsoport legismertebb és legnagyobb mortalitással rendelkező tagja az iszkémiás szívbetegségek csoportja, mely Magyarországon a CVD általi halálozások közel 50%-áért felelősek. Az iszkémiás szívbetegségek közé tartozó akut miokardiális infarktus (AMI) jelenti a legnagyobb egészségügyi problémát. Az iszkémiás szívbetegségek közös tulajdonsága a szívizom oxigén- és tápanyag hiányos állapota a csökkent vérellátás következtében. Az AMI kialakulásához leggyakrabban a magas koleszterinszint miatt a koronária erekben létrejött atheroszklerotikus plakk megrepedése vezet, ami az ér trombotikus elzáródását és az ér által ellátott szívizom terület elhalását okozza. Napjainkig a leghatékonyabb AMI károsodást csökkentő kezelés a perfúzió minél gyorsabb visszaállítása trombolízis terápia vagy a perkután koronária intervenció alkalmazásával. A perfúzió helyreállítása elengedhetetlen a szívfunkció romlásának hosszútávú csökkentéséhez, azonban sejtszinten további károsodást és sejtelhalást okoz, melyet reperfúziós károsodásnak nevezünk. Fontos megemlíteni, hogy mai napig nincs hatékony sejtvédő terápia, mely az AMI-indukálta celluláris károsodásokat és a szívizom sejtek elhalását célozná meg, ezért az új terápiás megközelítések fejlesztése, amelyek a sejtszintű folyamatok modulálásán keresztül a miokardiális infarktus méretének csökkentésére használhatóak, nagy klinikai relevanciával bírnak.

A miokardiális iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodás sejtszintű folyamat, melynek pontos patomechanizmusa nem ismert. Az I/R patogenezisében résztvevő multifaktoriális folyamatok a sejtelhalás és túlélés párhuzamos szabályozásán keresztül befolyásolják a szívizomsejtek károsodásra adott válaszát. Az I/R sérülés során a sejtelhalás mindkét formája, az apoptózis és nekrozis mellett az autofágia, mint sejttúlélést elősegítő folyamat játszik szerepet a károsodás kivédésében a sérült sejtszervek és makromolekulák lebontásából újrahasznosítható intermedierek előállításával.

A szívizom köztudottan rendkívüli adaptációs képességgel bír, mely intenzív kutatási témává vált az utóbbi három évtizedben. Kísérletes adatok állnak rendelkezésre a szívizom iszkémiás prekondicionálhatóságáról, mely során rövid, iszkémia/reperfúziós ciklusokat alkalmaznak a teszt iszkémiát megelőzően. Az iszkémiás prekondicionálás (IPre) képes csökkenteni az iszkémia következtében kialakult infarktusméretet kísérletes állatmodellben. Az IPre egy jól jellemzett adaptív válaszméchanizmus azonban mint prekondicionálási megközelítés humánban sajnos alacsony klinikai relevanciával rendelkezik. Klinikai

jelentősége ennek ellenére mégsem elhanyagolható, ugyanis celluláris folyamatainak tanulmányozása rendkívül hasznos információkat szolgáltatott a sejtszinten végmenő mechanizmusokról, melynek komponensei potenciális célmolekulák lehetnek a prekondicionálás farmakológiai kiváltásában. A farmakológiai prekondicionálás (FPre) célja az IPre-indukálta protektív mechanizmus mimikálása, a szervezetben található védőmechanizmusok befolyásolásán keresztül.

Egyik lehetséges FPre mód, a szívizomsejtek stressz adaptációjában szerepet játszó extracelluláris mátrix alkotóinak alkalmazása protekció kiváltására. Ezt a koncepciót megerősítő kísérletes adatok állnak rendelkezésre az injektálható, ECM decellularizálásával létrehozott hidrogél kardiális remodelling csökkentő és javult ejekciós frakciót eredményező hatásáról. Emellett az ECM komponens kis leucin-gazdag proteoglikán biglikán esetén is állnak rendelkezésre kardioprotektív hatást alátámasztó adatok. Bereczki és munkatársai megfigyelték, hogy a biglikánt szívspecifikusan overexpresszáló egerekben számos, a kardioprotekcióban részt vevő gén expressziója megemelkedett.

A biglikán egy 43 kDa core protein és két nagy molekulatömegű glükózaminoglikán (GAG) oldalláncot tartalmaz, mely szövetspecifikusan lehet dermatán szulfát vagy kondroitin szulfát.

A biglikán kardiovaszkuláris rendszerben betöltött szerepéről ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Kimutatták mRNS-ének emelkedett expresszióját atheroszklerózisban és szívelégtelenségben. Ezzel ellentétben biglikán hiányában abnormalis, hosszan elnyúló remodelling és emelkedett mortalitás volt megfigyelhető koronária lekötött egerekben, mely a biglikán kardioprotektív hatására enged következtetni. Ezzel összhangban kutatócsoportunk egy korábbi munkájában kimutatta, hogy exogén adagolt biglikán képes a primer neonatális szívizomsejtek szimulált iszkémia/reperfúziós (SI/R) károsodását kivédeni, azonban a kardioprotektív hatása mögött álló mechanizmus nem ismert. A biglikán számos sejtfelszíni receptor ligandjaként befolyásolhatja a sejtek működését, melyek lehetnek integrin receptorok, növekedési faktor receptorok, Toll-like receptorok és Scavenger A receptorok makrofágokon, melyek szerepét a kardioprotektív hatásban azonban nem vizsgálták.

Számos tanulmányban kimutatták, hogy az IPre globális génexpressziós változásokat indukál, ebből adódóan a gén- és fehérje expresszió szabályozása emelkedett sejttúléléshez és hatékonyabb stressz adaptációhoz vezethet. A génexpresszió szabályozása több szinten valósul meg, melyek közül napjainkban a mikroRNS-ek általi poszttranszkripcionális modulációra egyre nagyobb hangsúlyt fektet a szakirodalom.

Egyre nagyobb irodalom támasztja alá a mikroRNS (miRNS) fontos szerepét a szív különböző fiziológiás és patológias folyamataiban, mint a szívfejlődés, szívizomsejt kontrakció vagy a különböző stresszre adott sejtválasz. A miRNS-ek kis, 21-25 nukleotidból felépülő nem kódoló RNS molekulák, melyek szinte minden élő organizmus genomjában megtalálhatóak és jelentős poszttranszkripcionális szabályozást tesznek lehetővé. Számos tanulmányban utalnak arra, hogy a szintetizált miRNS modulátorok, mint mimikék és inhibitorok, melyek “lemásolják” és gátolják a szervezetben található miRNS-ek funkcióját, jelentős klinikai terápiás potenciállal rendelkezhetnek. Ezzel összhangban a specifikus mikroRNS modulátorok alkalmazása egy alternatív és hatékony terápiás megközelítést eredményezhet az I/R károsodás ellen.

Célkitűzés

Ezen irodalmi adatok ismeretében, jelen tézisben célul tűztük ki a biglikán és mikroRNS modulátorok alkalmazását, mint farmakológiai prekondicionálási stimulus vizsgálatát primer neonatális kardiomiocita tenyészetek szimulált iszkémia/reperfúziós (SI/R) károsodásával szemben.

A) A biglikán kardioprotektív hatásának vizsgálata során célul tűztük ki :

- a protektív hatás kiváltásában részt vevő komponensének meghatározását (core protein vagy GAG oldalláncok felelősek-e a kardiocitoprotekcióért).
- a Toll-like receptor 4 szignalizáció, jól ismert kardioprotektív mediátorok (nitrogén-monoxid, protein kináz B, ERK), oxidatív stressz elleni védelem, sejthalál gátlás és sejttúlélés szerepének kimutatását.

B) Második célkitűzésünk az iszkémiás prekondicionálás hatására változó expressziót mutató mikroRNS-ek modulátoraival FPre kiváltása primer neonatális kardiomiocita sejtenyészetek SI/R károsodásával szemben.

Anyagok és módszerek

A biglikán kardiocitoprotektív hatásának karakterizálása

A két, kémiaiilag eltérő komponens (core protein + GAG) kardioprotekcióban betöltött szerepének meghatározásához, egy előkísérletben a natív, GAG-okat is tartalmazó biglikánt Kondroitináz ABC enzimmel emésztettük. A kétnapos primer neonatális szívizomsejt tenyészeteket 0-100 nM natív (GAG-tartalmú), vagy deglikanált biglikánnal kezeltük 20 órára, amit 150 perc SI és 120 perc szimulált reperfúzió követett, mialatt a

kezeléseket fenntartottuk. A SI/R-t követően elhalt sejtek aránya került meghatározásra Tripán kék festéssel.

A core protein kardioprotektív hatásának megerősítése egy külön kísérletben, a szívizomsejteket 0-100 nM natív biglikánnal, GAG-mentes rekombináns humán biglikán core fehérjével (rhBGNc), dermatán szulfáttal vagy kondroitin szulfáttal kezeltünk 20 óráig, a 240 perc SI-t és 120 perc szimulált reperfüziót megelőzően. A SI alatt a sejteket hipoxiás oldattal fedve, multigáz inkubátorban tartottuk, melyet 0,4% O₂, 5% CO₂, 94,6% N₂ arányú gázkeverékkel áramoltattunk. Ezzel párhuzamosan a SI/R-okozta sejtelhalás meghatározásához a szívizomsejt tenyészetek egy csoportját mobil 96-lyukú tenyésztőedényben tenyésztettünk, normoxiás oldattal fedtünk és standard CO₂ inkubátorban 240 perc normoxiának és 120 perc szimulált reperfüziónak tettünk ki. A reperfüzió végén calcein esszé segítségével meghatároztuk a sejtek életképességét. A SI/R protokollra vonatkozó különböző kezelésekkel kapott adatokat a SI/R-indukálta sejtelhalás százalékában fejeztük ki.

A biglikán kezelés direkt citoprotekciójának bizonyítására megvizsgáltuk stresszmentes körülmények közötti hatását a szívizomsejtek proliferációjára és életképességére, 5'-bromo-2'-deoxiuridin (BrdU) beépülési, valamint calcein esszé segítségével.

A következőkben a rhBGNc apoptózisra, nekrozisra és autofágiára gyakorolt hatását vizsgáltuk SI/R jelenlétében. Ehhez a primer neonatális szívizomsejt kultúrákon SI/R-t végeztünk 10 nM rhBGNc kezelés jelenlétében vagy hiányában a fent említett módon. A nekrozis kimutatására extracelluláris laktát dehidrogenáz (LDH) enzimaktivitás mérést alkalmaztunk. A rhBGNc apoptózisra gyakorolt hatásának vizsgálatára aktivált kaszpáz-3 immunfestést, míg az intrinsic útvonal érintettségének megállapítására a mitokondriális membrán potenciál változások követésére alkalmas JC-1 festést, az autofágia szerepének bizonyítására LC3I/II immuncitokémiát és western blot technikát végeztünk.

A TLR4 receptor szerepének meghatározására, 10 nM rhBGNc kezelést alkalmaztunk speciális TLR4 szignalizáció inhibitor, a TAK-242 vagy egy TLR4 antagonista lipopoliszacharid (*Rhodobacter Sphaeroides* lipoprotein; LPS-RS) jelenlétében 20 órás előkezelést követő SI/R protokollban. A sejtek életképességét calcein esszé segítségével határoztuk meg. A résztvevő downstream mechanizmusok azonosítására a két napos szívizomsejt kultúrák 10 nM rhBGNc kezelést kaptak Interleukin-1 receptor asszociált kináz 1/4 (IRAK-1/4), Extracellular signal-related protein kináz (MEK/ERK), JUN N-terminális

kináz (JNK) és p38 mitogén-aktivált protein kináz (p38 MAPK) inhibitorok jelenlétében vagy hiányában.

A jól ismert kardioprotektív útvonalak érintettségének vizsgálatára, mint a “Reperfusion injury salvage kinase pathway” (RISK) és “Survival activating factor enhancement” (SAFE), a résztvevő fontos kinázok foszforilációs változásait határoztuk meg Western blot segítségével. A foszforilált és össz Akt (Protein kináz B), ERK1/2 és “Signal transducer and activator of transcription 3” (STAT3) fehérjéket vizsgáltuk 20 órás rhBGNc kezelést követően. Az ERK1/2 aktivációt a gyors foszforilációs ciklus miatt 10 perces, 1 órás és 20 órás rhBGNc kezelés után is detektáltuk.

A nitrogén-monoxid szerepének és rhBGNc oxidatív stresszt moduláló hatásának megállapításra, a sejt kultúrákat 20 órára 10 nM rhBGNc-vel kezeltünk majd megmértük a kardiomiociták NO tartalmát electron spin rezonancia, szuperoxid termelését dihidroetidium (DHE) festéssel. Egy külön kísérletben, a sejteket 10 nM rhBGNc-vel 20 órára NO szintáz gátló “N ω -Nitro-L-arginin metil észter hidroklorid” (L-NAME) jelenlétében vagy hiányában. A sejtek viabilitását calcein esszével határoztuk meg. A szívizomsejtek szuperoxid termelését normoxiás és SI/R protokollt követően rhBGNc kezelés mellett és hiányában is megvizsgáltuk.

A biglikán potenciális antioxidáns hatásának vizsgálatára egy korábbi kísérletben beállított H₂O₂-indukálta citotoxicitás modellt alkalmaztunk. Ehhez az egy napos szívizomsejt kultúrákat 20 órára különböző koncentráció biglikánnal kezeltünk, amit 24 órás 50 μ M H₂O₂ kezelés követett, mely alatt a megfelelő biglikán koncentrációkat fenntartottuk. A protokoll végén viabilitás mérést végeztünk.

Az iszkémiás prekondicionálás- asszociált miRNS-ek kardioprotektív hatásának vizsgálata

A kutatócsoportunk vizsgálta az iszkémiás prekondicionálás hatására bekövetkező mikroRNS expresszió változásokat Langendorff-perfundált patkány szívekben. A microarray adatok alapján 3 mikroRNS-t választottuk ki a kardiocitoprotektív hatás megerősítésére: a mikroRNS-139-5p és mikroRNS-125b* mimikeket és mikroRNS-487b inhibitor. A két napos primer neonatális szívizomsejt kultúrákat transzfektáltuk a kiválasztott mikroRNS modulátorokkal, melyet 240 perc SI és 120 perc szimulált reperfüzió követett. A protokoll végén calcein esszével viabilitás mérést végeztünk.

Eredmények

Mind a natív, mind a deglikanált biglikán véd a szívizomsejtek SI/R károsodásával szemben.

A primer neonatális kardiomiociták natív biglikán kezelése dóziszfüggően csökkentette a SI/R-indukálta sejtelhalást. A natív biglikánhoz hasonlóan, a kondroitináz ABC-vel emésztett deglikanált biglikán kezelés is dóziszfüggő protekciót váltott ki. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a core protein szükséges a natív biglikán kardiocitoprotektív hatásához.

A biglikán kardiocitoprotektív hatásában a core protein játszik szerepet.

A core protein és GAG oldalláncok szerepének megerősítésére, a natív biglikán mellett egy GAG-mentes, rekombináns biglikán core proteint, valamint dermatán és kondroitin szulfátot használtunk a szívizomsejtek 20 órás előkezelésére. Kísérleteink során a SI/R szigfinikánsan, mintegy 30%-kal csökkentette a szívizomsejtek viabilitását a normoxiás kontrollhoz képest. A natív biglikán ebben a kísérleti elrendezésben is koncentráció függően csökkentette a szívizomsejtek SI/R okozta elhalását. A SI/R-indukálta sejthalált a rhBGNC kezelés szintén dóziszfüggően, a 3 és 10 nM koncentrációban pedig szignifikánsan csökkentette a sejtelhalást a vivőanyag kontrollhoz képest. A GAG-ok potenciális védő hatásának tesztelésére a natív biglikánban található GAG koncentrációknak megfelelően 20 órás dermatán vagy kondroitin szulfát kezelést alkalmaztunk a SI/R-t megelőzően, azonban egyik GAG sem rendelkezett védő hatással.

Biglikán core protein nem befolyásolja a sejtproliferációt.

A biglikán indukálta SI/R utáni emelkedett viabilitás lehetséges okaként felmerült a biglikán core protein esetleges proliferációt befolyásoló tulajdonsága, ezért a szívizomsejteket stresszmentes, fiziológiás körülmények között kezeltünk rhBGNC-vel 20 órára, majd BrDU esszé segítségével meghatároztuk a sejtproliferáció mértékét, valamint calcein esszével a viabilitást. A BrDU és calcein esszék eredménye alapján a core protein kezelés nem a proliferáció növelésén keresztül fejti ki kardioprotektív hatását.

A biglikán core protein kezelés befolyásolja a SI/R- indukálta apoptózist, nekrozist és autofágiát.

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy rhBGNC-indukálta protekcióban az apoptózis, nekrozis és autofágia folyamatainak modulálása részt vesznek-e. Ehhez a korábbi protokollhoz hasonlóan a kétnapos kardiomiocitákat 20 órára 10 nM rhBGNC-vel kezeltünk, melyet SI/R követett. A protokoll végén meghatároztuk a nekrozisra jellemző citoplazmatikus

LDH felszabadulást a sejtek felülúszójában. A SI/R hatására a felülúszóban mérhető LDH aktivitás szignifikánsan megemelkedett a kontroll normoxiás csoporthoz képest, azonban a rhBGNc alkalmazásakor ez a szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető.

A rhBGNc indukálta protekció további karakterizálásához, az apoptózis kései fázisában aktiválódó, hasított kaszpáz-3 szintet határoztuk meg immunfestés segítségével. A kaszpáz-3 aktivitás SI/R által indukált szignifikáns emelkedését a rhBGNc kezelés szignifikáns mértékben csökkentette. Ezen eredmények a rhBGNc antiapoptotikus hatását támasztják alá.

A mitokondriális apoptózis útvonal vizsgálatához JC-1 festést alkalmaztunk. Ezen festék monomer formában zöld, mely membránpotenciál változás függően képez piros fluoreszcens aggregátumokat. Mikor a mitokondriumok struktúrálisan és funkcionálisan sérülnek a JC-1 piros/zöld fluoreszcencia hányadosa lecsökken. Kísérleteinkben a SI/R hatására a mitokondriális membrán potenciál szignifikánsan lecsökkent, melyet kis mértékben javított a rhBGNc kezelés. Eredményeink alapján a rhBGNc antiapoptotikus hatásában a mitokondriális membrán potenciál függő út elhanyagolható.

A rhBGNc autofágiára gyakorolt hatását az autofágiás vakuolumokban megtalálható LC3 immunhisztokémiai kimutatásával és western blot analízissel vizsgáltuk. A SI/R szignifikáns mértékben csökkentette az autofágiát a normoxiás kontrollhoz képest, míg a rhBGNc kezelés közel normál szintre emelte.

A Toll-like receptor 4 útvonal részt vesz a biglikán core protein citoprotektív hatásában.

A biglikán core protein kardiocitoprotektív hatása és a Toll-like receptor 4 jelút közti kapcsolat igazolására, a kétnapos primer neonatális kultúrák kezeléséhez a rhBGNc mellett a jelút specifikus inhibitorait alkalmaztuk (TLR4 receptor gátló TAK-242 és a receptor antagonist LPS-RS, valamint a jelút downstream komponenseinek - IRAK-1/4, MEK/ERK, JNK, és p38 MAP kináz - inhibitorait). A TAK-242 és LPS-RS kezelés csökkentette a biglikán core protein kardiocitoprotektív hatását a SI/R károsodással szemben, míg az inhibitorokat önmagukban adagolva nem voltak hatással a sejtek életképességére. A TLR4 receptor ligand LPS-RS és TAK 242 esetében kapott eredmények alapján elmondható, hogy az exogén adagolt rhBGNc receptor mediálta folyamaton keresztül fejti ki protektív hatását.

A TLR4 downstream szignalizáció szerepének kimutatására, a résztvevő mediátorok specifikus farmakológiai inhibitorait (IRAK-1/4, MEK/ERK, JNK, és p38) használtuk a rhBGNc kezeléssel kombináltan. A biglikán core protein szignifikánsan lecsökkentette a SI/R-indukálta sejtelhalást, melyet az inhibitorok jelenléte minden esetben mérsékelte. Az

inhibitorok önmagukban nem befolyásolták a szívműködő sejtek viabilitását SI/R-t követően. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a rhBGNc kardioprotektív hatásában a TLR4 szignalizáció fontos szereppel bír.

A biglikán core protein fokozza az ERK és Akt foszforilációt.

A jól ismert kardioprotektív Akt, STAT3, ERK1/2 potenciális szerepének vizsgálatára a sejt kultúrákat 20 órára rhBGNc-vel kezeltük. A kapott eredmények alapján, a rhBGNc kezelés szignifikáns mértékben fokozza az Akt foszforilációt, míg az ERK1/2 és STAT3 aktiválására nincs hatással. Mivel az ERK1/2 TLR4 jelátviteli mediátor és ismert gyors foszforilációs kinetikájáról, 10 perc és egy óra rhBGNc kezelési idő mellett is megvizsgáltuk az ERK1/2 foszforiláció mértékét, s a rövidebb kezelések szignifikánsan megemelkedett aktivitást eredményeztek, mely a 20 órás előkezelés végére lecsengett.

A nitrogén-monoxid részt vesz a biglikán core protein indukálta kardioprotekcióban.

A nitrogén-monoxid szerepének vizsgálatára a rhBGNc protektív hatásában, 20 órás rhBGNc kezelést követően megmértük a sejtek NO tartalmát elektronspin rezonancia spektroszkópia segítségével. A kardiomiociták NO termelése a rhBGNc kezelés következtében szignifikánsan megemelkedett, mely a NO szerepére utal a hatásmechanizmusban. Egy másik kísérletben a NO szintáz gátló L-NAME szignifikánsan lecsökkentette a rhBGNc protektív hatását, ami tovább erősíti a NO érintettségét a citoprotekcióban.

A biglikán core protein csökkenti a SI/R-indukálta szuperoxid termelést.

A SI/R folyamatában az oxidatív stressz jelentős sejtkárosító hatással bír, így megvizsgáltuk a biglikán core proteinnel kezelt kardiomiocita tenyészetek szuperoxid termelését SI/R protokoll mellett és hiányában. A rhBGNc kezelés stresszmentes körülmények között nem volt hatással a szívműködő sejtek szuperoxid termelésére, míg a SI/R-t követő megemelkedett szuperoxid szintet szignifikáns mértékben csökkentette.

A natív biglikán csökkenti H₂O₂- indukálta citotoxicitást.

A biglikán antioxidáns hatásának megerősítésére felállítottunk egy H₂O₂-indukálta sejt elhalás modellt. Az egynapos szívműködő sejt kultúrákat 0, 3, 10, és 30 nM biglikánnal 20 órára kezeltünk elő, majd 50 µM H₂O₂-ot alkalmaztunk 24 órára, s ezalatt a biglikán kezeléseket fenntartottuk. A protokoll végén viabilitás tesztet végeztünk. Eredményeink alapján a H₂O₂ kezelés szignifikánsan lecsökkentette a sejttúlélést, a biglikán azonban

dózisfüggően mérsékelte a H_2O_2 –indukálta sejtelhalást. Ezen eredmények erősítik a biglikán oxidatív stresszt csökkentő hatását.

Prekondicionálás-asszociált miRNS modulátorok védik a primer neonatális szívizomsejt kultúrákat a SI/R okozta károsodástól.

Kutatócsoportunk megvizsgálta az IPre-indukálta miRNS változásokat Langendorff-perfundált szívekben. Az expressziós eredmények alapján kiválasztottunk 3 miRNS-t, s ezek expressziós változásainak megfelelő modulátoraival (emelkedés esetén mimik, csökkenés esetén inhibitor alkalmazásával) oki szerepüket kívántuk bizonyítani primer neonatális kardiomiocita tenyészetekben a SI/R károsodás elleni védelemben. Ehhez a szívizomsejt tenyészeteket miR-139-5p és miR-125b* mimikkel, illetve miR-489b inhibitorral transzfektáltuk SI/R-t megelőzően. Kísérleteinkben a SI/R szignifikánsan lecsökkentette a sejtek túlélését, azonban mindhárom miRNS modulátor transzfektálásával a SI/R sejtkárosító hatása mérsékelhető volt. Ezen eredmény megerősíti, hogy egyes prekondicionáláshoz asszociált mikroRNS-ek modulátorai potenciális farmakológia prekondicionáló tulajdonsággal rendelkeznek, s ez egy ígéretes irányvonal lehet az AMI terápiájában történő hasznosításra a jövőben.

Diszkusszió és konklúzió

Új eredmények:

1. A biglikán core protein védi a szívizomsejteket a SI/R károsodástól, míg a GAG oldalláncok nem rendelkeznek citoprotektív hatással.

Jelen tézisben megerősítettük, hogy a biglikán csökkenti a SI/R-okozta sejtelhalást. Emellett kutatócsoportunk publikálta először, hogy a biglikán core protein felelős a kardiocitoprotekcióért, míg a GAG oldalláncok nem képesek a protekció kiváltására.

2. A rhBGNc modulálja a SI//R nekrozisra, apoptózisra és autofágiára kifejtett hatását.

A SI/R hatására a felülszóban mérhető LDH aktivitás szignifikánsan megemelkedett a kontroll normoxiás csoporthoz képest azonban a rhBGNc alkalmazásával ez a szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető. Az apoptózis effektor kaszpáz-3 SI/R-indukálta szignifikáns aktivitás emelkedését a rhBGNc kezelés szignifikáns mértékben csökkentette. Kísérleteinkben a SI/R hatására a mitokondriális membrán potenciál szignifikánsan lecsökkent, melyet kis mértékben a rhBGNc kezelés javított. A sejtek túlélését elősegítő

autofágia a SI/R hatására szignifikáns mértékben lecsökkent a normoxiás kontrollhoz képest, míg a rhBGNc kezelés közel normál szintre emelte.

3. A Toll-like receptor 4 szignalizáció részt vesz a biglikán core protein kardiocitoprotektív hatásának kialakításában.

A TLR4 jelút komponenseinek specifikus farmakológiai inhibitorainak alkalmazásával kimutattuk, hogy a biglikán core protein indukálta kardioprotekció a TLR4 szignalizáción keresztül valósul meg, mely az adaptor mediátor IRAK1/4 és downstream targetjeit, az ERK, JNK és p38 MAP kinázok aktivációját is magába foglalja.

4. A Biglikán core protein fokozza az Akt és ERK foszforilációját, valamint a NO termelést.

A kardiomiociták biglikán core protein kezelése növekedett Akt és ERK1 foszforilációt és emelkedett NO termelést eredményezett.

5. Biglikán antioxidáns hatással bír.

A natív biglikán koncentrációfüggően megemelte a szívizomsejtek túlélését a H_2O_2 – indukálta citotoxicitás ellen. A rhBGNc ezzel egybehangzóan a SI/R okozta megemelkedett szuperoxid termelést szignifikánsan lecsökkentette, mely eredmények a biglikán antioxidáns hatását erősítik.

6. A prekondicionáláshoz asszociált miRNA-k modulátorai védik a primer neonatális szívizomsejteket a SI/R károsodással szemben.

A miR-139-5p és miR-125b* mimikék, valamint a miR-487b inhibitor transzfekciójával a SI/R sejtkárosító hatása mérsékelhető volt.

Jelen munkában igazoltuk, hogy a biglikán core protein és IPre- asszociált miRNS modulátorok farmakológiai prekondicionálást kiváltó hatással rendelkeznek, mely potenciális terápiás alkalmazhatóságukat támasztja alá az AMI sejtvédő terápiájában. Eredményeink alapján elmondható, hogy a biglikán protektív hatásában a core protein játszik szerepet. Az irodalomban elsőként írtuk le, hogy a rhBGNc kezelés SI/R-t követően befolyásolja az apoptózist, nekrozist és az autofágia folyamatait. Kimutattuk, hogy a citoprotekcióban a TLR4 és downstream mediátorai vesznek részt, emellett a kardiomiociták rhBGNc kezelése emelkedett Akt és ERK foszforilációt, megnövekedett NO termelést okoz, melyek a protektív hatás kiváltásában játszhatnak szerepet. A jövőben a rhBGNc, mint sejtvédő hatású molekula, új potenciális terápiás lehetőséget kínálhat a miokardiális infarktus kezelésében. A prekondicionálással asszociált miRNS-ek modulátorai, mint a miR-139-5p és miR-125b*

mimikék, valamint a miR-487b inhibitor, melyek “lemásolják” és gátolják a szervezetben található miRNS-ek funkcióját, jelentős klinikai terápiás potenciállal rendelkezhetnek.

Köszönetnyilvánítás

Kísérleteink a Magyar Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal [TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035, and OTKA-K115990, OTKA-K79167, OTKA-PD-106001, OTKA-NN-113153]; és a Nemzeti Agykutató Program támogatásával készült (KTIA_NAP_13-A_III/9).

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Dux Lászlónak** a Biokémiai intézet vezetőjént, hogy lehetővé tette munkámat az intézet falai között.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Csont Tamásnak** és **Dr. Görbe Anikónak** a folyamatos támogatásukért és motiváló közegért a doktori tanulmányaim során.

Köszönöm **Tamásnak** a tudományos iránymutatását, türelmét és hasznos javaslatait, melyeket a PhD éveim alatt adott. Hálás vagyok a Metabolikus betegségek és Jelátvitel jelenlegi és volt tagjainak: **Csonka Csabának, Sárközy Mártának, Sója Andreának, Gömöri Kamillának, Pipicz Mártonnak, Diószegi Petrának.**

Hálás vagyok az “1-es laborból” **Makráné Felhő Zitunak, Csontosné Erzsikének** a western blot rejtelseiben nyújtott segítségéért és lelki, szinte “anyai” támogatásáért. **Szabó Kitti**nek az együtt eltöltött munkás hétvégékért, valamint a Biokémiai Intézet többi tagjának a tudományos támogatásukért és a barátságos légkörért.

Köszönetet szeretnék mondani **Török Szilviának, Engi Ildikónak, Kovács Juditnak, Lajtos Tivadarné Zsuzsinak** és **Pipis Juditnak** a technikai és adminisztratív segítségükért, mellyel elősegítették jelen disszertáció elkészülését.

Szeretném kifejezni hálámat TDK hallgatóimnak: **Demján Virágnak, Hawchar Fatimének, Vincze Annának, Ernesto Ruivo és Miguel Olias Ibor** külföldi hallgatóimnak a sikerekben gazdag közös munkáért és a baráti támogatásért a közös munkáink során nemcsak munkatársként hanem barátként is.

Szeretnék köszönetet mondani kollaborátoraimnak: **Petrovski Gorannak, Luna Djirackornak, Kiricsi Mónikának, Kovács Dávidnak és Gácsér Attilának.**

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani **Török Szilvának** és **Kiricsi Móninak**, akik átsegítettek a nehéz időszakaimon és végig támogattak. Szeretném megköszönni **barátaimnak, családomnak**, különösen **édesanyámnak** és **páromnak** a rendületlen támogatását és szeretetét. Nélkületek nem sikerült volna. A disszertációmát nektek ajánlom.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott **Dr. Varga Zoltán** (felelősséltárs szerző) kijelentem, hogy **Gáspár Renáta** (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a pontokat más, a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2016. január. 18

dátum



szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: protectomiRs.

Varga ZV, Zvara A, Faragó N, Kocsis GF, Pipicz M, Gáspár R, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Puskás LG, Thum T, Csont T, Ferdinandy P.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014 Jul 15;307(2):H216-27. doi: 10.1152/ajpheart.00812.2013. Epub 2014 May 23.

PMID: 24858849 Free Article